

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-155780

(43)Date of publication of application : 03.07.1991

(51)Int.Cl.

C12N 9/06  
C12Q 1/26  
//(C12N 9/06  
C12R 1:66 )

(21)Application number : 01-294054

(71)Applicant : NODA SANGYO KAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 14.11.1989

(72)Inventor : HORIUCHI TATSUO  
KUROKAWA YOSHIKO

**(54) FRUCTOSYLAMINE OXIDASE, ITS PRODUCTION, DETERMINATION OF AMADORI COMPOUND USING THE ENZYME AND REAGENT THEREFOR**

(57)Abstract:

**NEW MATERIAL:**The fructosylamine oxidase having the following physical and chemical properties. Action and substrate specificity, oxidizing amadori compound in the presence of oxygen and catalyzing the reaction to form a- ketoaldehyde, amine derivative and hydrogen peroxide; especially active to the amadori compound consisting of a-amino acid, β-amino acid, &epsi;-amino acid or D-amino acid derivative; optimum pH, 7.5-8.5 (phosphoric acid buffer) when fructosylglycine is used as the substrate; stable pH, 7.5-11.0; optimum temperature, 30-43° C; heat-stability, stable to the heating at 37° C for 10min and ≥70% of the compound is inactivated by heating at 50° C for 10min; molecular weight, 80,000-83,000 (gel-filtration).

**USE:** Enzyme for the quantitative determination of amadori compound.

**PREPARATION:** A microbial strain belonging to genus *Aspergillus* such as *Aspergillus* sp.1005 (FERM BP-2651) is cultured at 30° C and pH6.5 for 30-72hr.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-155780

⑬ Int. Cl. 9

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)7月3日

C 12 N 9/06  
 C 12 Q 1/26  
 //C 12 N 9/06  
 C 12 R 1:66)

Z 7823-4B  
 6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全10頁)

⑮ 発明の名称 フルクトシルアミン・オキシダーゼ、その製造法、該酵素を用いた  
 アマドリ化合物の定量法及びその試薬

⑯ 特 願 平1-294054

⑰ 出 願 平1(1989)11月14日

⑱ 発 明 者 堀 内 達 雄 千葉県野田市野田399番地 財団法人野田産業科学研究所  
 内

⑱ 発 明 者 黒 川 淑 子 千葉県野田市野田399番地 財団法人野田産業科学研究所  
 内

⑲ 出 願 人 財団法人野田産業科学 千葉県野田市野田399番地  
 研究所

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

フルクトシルアミン・オキシダーゼ、その製造法、該酵素を用いたアマドリ化合物の定量法及びその試薬

## 2. 特許請求の範囲

1. 下記の理化学的性質を有するフルクトシルアミン・オキシダーゼ。

(a) 作用及び基質特異性

酵素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 $\alpha$ -ケトアルデヒド、アミン誘導体、及び過酸化水素を生成する反応を触媒する。アマドリ化合物が $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\epsilon$ -アミノ酸、D-アミノ酸の誘導体であるものに良く作用する。

(b) 至適 pH 及び安定 pH 範囲：至適 pH 範囲はフルクトシルグリシンを基質とした場合に pH 7.5 ~ 8.5 (リン酸緩衝液)、安定 pH 範囲は 7.5 ~ 11.0。

(c) 作用適温の範囲：30℃ ~ 43℃。

(d) 熱安定性：37℃、10分間の加熱に対して安定であるが50℃、10分間の加熱により70%以上失活する。

(e) 分子量：セファデックス G-200 カラムを用いたゲル濾過法で測定した値は約 80,000 ~ 83,000 である。

2. アスベルギルス属に属しフルクトシルアミン・オキシダーゼ生産能を有する菌株を培地に培養し、培養物よりフルクトシルアミン・オキシダーゼを採取することを特徴とするフルクトシルアミン・オキシダーゼの製造法。

3. アマドリ化合物を含有した試料にフルクトシルアミン・オキシダーゼを作用させ酸化反応により消費される酵素量を測定するか、又は該反応により生成する過酸化水素を測定することを特徴とするアマドリ化合物の定量法。

4. フルクトシルアミン・オキシダーゼを含むアマドリ化合物測定用試薬。

## 3. 発明の詳細な説明

## &lt;産業上の利用分野&gt;

本発明は、新規な酵素フルクトシルアミン・オキシダーゼとその製造法、及び該酵素を使用する試料中のアマドリ化合物の定量法、並びにその試薬に関する。

## &lt;従来の技術及び問題点&gt;

フルクトシルアミン化合物は、アルドースとアミノ基を持った化合物が接触した時からアマドリ化合物として非酵素的に生産され、その濃度は両者の濃度と接触時間に比例して増加することが知られている。つまりフルクトシルアミン化合物の濃度は、糖とアミノ基を持った化合物が、どの様な濃度または温度でどの位接触していたのかという過去の情報を提供するものであり、従ってこの化合物の定量は、糖やアミノ基を多量に含んだ製品、例えば醤油や味噌あるいは輸液等の製造や貯蔵管理を行なう上で有用である。また臨床検査においては、血液中におけるこの種の化合物のうち、ヘモグロビンに結合したフルクトシルアミン化合

物をグリコヘモグロビン (HbA<sub>1</sub>) と呼び、また血清中に存在する主としてアルブミンに結合したフルクトシルアミン化合物をフルクトサミンと呼んで、それぞれ糖尿病の病態を現わすものとして盛んに測定している。

しかしその測定法は高速液体クロマトグラフィーを利用した方法 [Chromatogr. Sci. 10 659 (1979)]、ホウ酸を結合させた固体をカラムにつめて吸着させた後、これを溶出する方法 [Clin. Chem. 28 2088 (1982)]、ゲルをベッドにして電気泳動を行なう方法 [Clin. Chem. 26 1598 (1980)] などがあるが、いずれも操作性や精度の点、又は高価な機器を必要とするなど欠点が多い。またフルクトサミンの測定法として最近になって急速に発展した方法にフルクトシルアミン化合物の示すアルカリ性における還元作用を色素の発色に結びつける方法 [Clin. Chim. Acta. 127 87 (1983)] があるが、その反応の特異性と標準品の選択において問題がある。

本発明者等はこれらのフルクトシルアミン化合

物を酵素を用いて定量すべく、鋭意検討して来た。その結果、土壌中のコリネバクテリウム属に属する細菌から、フルクトシルアミノ酸に作用する酸化酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを発見し、先に特許出願を行なった。(特開昭 61-268178)

しかし、この酵素は $\alpha$ -アミノ酸のアマドリ化合物に対しては良く作用するが、 $\beta$ や $\epsilon$ のアミノ基についたフルクトースに対する作用に極めて弱いか、又は認められない。生体中アミノ酸には $\alpha$ -アミノ基の他に $\epsilon$ -アミノ基があり、どちらかというとな後に結合したフルクトース化合物の方が多い。そのためリジンの $\epsilon$ -アミノ基に結合したフルクトースの定量をも目指す場合には、その特異性の点でコリネバクテリウム属に属する細菌の酵素は使用することができなかった。

本発明者等は、更に広く土壌中微生物の中に、これらの化合物を分解する活性のある酵素を検索した結果、アミノ酸の $\alpha$ のみならず $\epsilon$ のアミノ基についたフルクトース化合物をも分解することが

できる酵素を生産するアスペルギルス属に属する糸状菌を発見し本発明を完成させた。

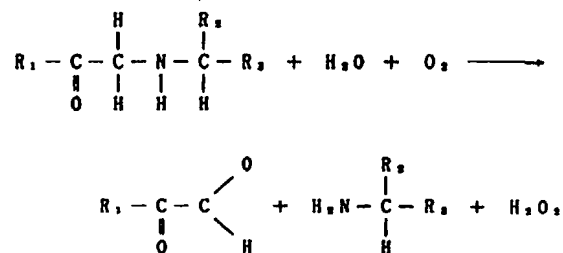
## &lt;問題点を解決するための手段&gt;

以下本発明を具体的に説明する。

本発明の酵素フルクトシルアミン・オキシダーゼの理化学的性質は下記の通りである。

## (1) 作用及び基質特異性

酵素の存在下で $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\epsilon$ -アミノ酸、D-アミノ酸のアマドリ化合物を分解して、グルコソンと過酸化水素及び対応する $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\epsilon$ -アミノ酸、D-アミノ酸を生成する反応を触媒する。



この式中、 $R_1$  は  $-(CH(OH))_n-CH_2OH$  であり、 $R_2$  は H 又は  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖残基、 $R_3$  は  $-(CH_2)_mH$ 、 $-(CH_2)_m-COOH$  又は  $-(CH_2)_m-CH(NH_2)-COOH$  である。 $n$  は 0 ~ 4 の整数である。

なお、本酵素は含有する N 原子に H 原子が 1 つしかない化合物であるイミノ酸（例えばプロリン）、N-メチルアミノ酸（例えばザルコシン）、あるいはモルホリン等のアマドリ化合物に対しては極めてわずかしか作用を示さない。アミン部分がアンモニアであるフルクトシルアミンにも少し作用するが、フルクトース残基中のケトン還元したもの、例えばグルシトリルグリシンに対しては作用しない。また、フルクトース以外の糖化合物に対しての反応はフルクトースのものに比較すると格段に小さい。

なお本酵素と特開昭 61-268178 号記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOX) の各基質に対する活性を第 1 表に示す。

第 1 表  
酵素の基質特異性

	FAOX	本酵素
D-フルクトシルグリシン	100	100
D-フルクトシル-L-バリン	132	250
D-フルクトシル-L-アラニン	180	251
D-フルクトシル-L-ロイシン	195	267
D-フルクトシル-D-ロイシン	0	142
D-フルクトシル-D-アラニン	0	46
D-フルクトシル- $\beta$ -アラニン	0	65
D-フルクトシル-L-リジン	0	33
D-フルクトシル- $\epsilon$ -カプロン酸	0	25
D-フルクトシル-グリシルグリシン	40	20
D-フルクトシル-ポリリジン	0	5*
D-フルクトシル-メチルアミン	0	6
D-フルクトシル-アミン	0	4
D-タガトシルグリシン	61	8
D-エリスロペンツロシルグリシン	76	2
マルツロシルグリシン	2	3

数値はそれぞれ D-フルクトシルグリシンに対する活性を 100 とした場合の比である。

\*：反応液中に 4 mg/ml で測定した。

#### (2) 至適 pH：

本酵素の至適 pH はフルクトシルグリシンを基質とした場合、第 1 図に示すごとく pH 7.5 ~ 8.2 である。測定は酵素の吸収速度をオキシゲンモニターで計測することにより行なった。なお図中の使用緩衝液は下記のとおりである。

○-○：0.1 M リン酸カリウム緩衝液

×-×：0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液

#### (3) pH 安定性：

本酵素 0.1 単位を含有する各種緩衝液 0.4 ml を 37℃、10 分間加熱し、残存した酵素活性を調べた。その結果は第 2 図に示す通りである。なお図中の使用緩衝液は下記のとおりである。

○-○：0.1 M リン酸カリウム緩衝液

△-△：0.1 M トリス-塩酸緩衝液

×-×：0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液

#### (4) 力価の測定法：

第 1 法：生成される過酸化水素を発色定量する方法

0.005 % 4-アミノアンチピリン及び 0.015

% 2,4-ジクロロフェノールサルホネートを含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 2.8 ml を試験管にとり、400 U/ml のパーオキシダーゼ溶液 10  $\mu$ l を加える。温度平衡を 37℃に達せしめたのち、適当な活性を有する酵素溶液 0.1 ml を加え、さらに 0.5 M フルクトシルグリシン 0.1 ml を加えて 10 分間反応させ、生じた色素を光電比色計を用いて 510 nm における吸光度を測定する。別にあらかじめ過酸化水素の標準溶液を用いて、その生成色素量との関係を図ったグラフを用意する。このグラフを用いて、37℃、1 分間当りに生成される過酸化水素のマイクロモルを計算し、この数字を使用酵素液中の活性単位とする。

第 2 法：酵素反応にともなって吸収される酸素量を測定する方法

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 2.9 ml を YSI 社製オキシゲンモニターの測定容器にとり、0.5 M フルクトシルグリシン 0.1 ml を加え 37 °C で 3 分間攪拌し、溶存酸素と温度を平衡に達せしめ、これに酸素電極を差し込み密閉したのち、酵素溶液 30  $\mu$ l を注入し、生じる酸素吸収をモニターに接続した記録計で連続的に計測し、その最初の速度を測定する。あらかじめ同様にして容器内の酸素濃度と記録値の間で標準曲線を作成し、これを用いて測定値から酸素濃度を求める。37 °C、1 分間当り 1 マイクロモルの酸素吸収を起こす酵素の活性を 1 単位とする。

#### (5) 作用適温の範囲：

フルクトシルグリシンを基質として、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で、各温度における酵素反応により生成したグリシンをアミノ酸分析計を用いて測定した。その結果は第 3 図に示す通りで、本酵素の作用適温の範囲は 30 °C ~ 43 °C である。

#### (9) 分子量：

本酵素の分子量は、セファデックス G-200 を用いたカラムゲル濾過法で測定した結果、0.1 M 食塩含有 0.05 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中では 80,000 ~ 83,000 であった。

#### (10) 等電点

ディスク焦点電気泳動により測定した結果、PI = 6.8 であった。

#### (11) ディスク電気泳動：

デービスの pH 9.4 のゲルを用いて 4 mA/ゲルで 5 °C、70 分泳動を行ない、酵素蛋白をクマジーブリリアントブルー G-250 で染色した。その結果、ゲルのアクリルアミド濃度 7.5 % の時は陽極側に 2.5 mm (ブロムフェノールブルーは 4.9 cm)、5 % の時には同じく陽極側に 11.5 mm の所に酵素活性を持つほぼ単一のバンドを認められた。

前記のように本酵素は、その作用及び基質特異性において従来全く知られていない新規な酵素である。

#### (6) 熱安定性：

精製酵素 0.02 単位を含有する酵素液 0.1 ml (0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.8) を各温度で 10 分間放置したのち、残存した酵素活性を調べた。その結果は第 4 図に示す通りで、37 °C 以下では安定であるが、50 °C で 70 % が失活する。

#### (7) 阻害、活性化及び安定化：

0.1 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、酸素吸収を測定することにより調べてみた。濃度 2 mM の各物質の本酵素に対する影響は下記の通りである。

Hg<sup>++</sup>、Cd<sup>++</sup>、Ni<sup>++</sup>、Zn<sup>++</sup>、Co<sup>++</sup>、Cu<sup>++</sup> は強く阻害し、Mg<sup>++</sup> は中程度に阻害する。NaN<sub>3</sub>、PCMB も酵素反応を強力に阻害する。また本酵素に対する活性化剤及び安定化剤については未知である。

#### (8) 精製方法：

本酵素は後記の精製方法によって精製することができる。

次に本発明によるフルクトシルアミン・オキシダーゼの製造法について説明する。

本発明において使用される微生物はアスペルギルス属に属し、フルクトシルアミン・オキシダーゼ生産能を有するものであればいずれでもよいが、具体例としてはアスペルギルス・エスピー (*Aspergillus* sp.) 1005 が挙げられ、該菌の変種もしくは変異株も用いられる。アスペルギルス・エスピー 1005 は本発明者らが土壌中より新たに分離した菌株であり、その菌学的性質は下記の通りである。

なお、菌の分類はおおむねレーパー (K.B.Raper) とフェネル (D.I.Fennell) 著の「ザ・ジェナス・アスペルギルス (The Genus *Aspergillus*)」(The Waverly Press) の記述に準拠した。

#### (1) 培地における生育状況

##### a) YpSs 培地 (25 °C 生育)

生育は普通で 4 日目で直径 37 mm に広がり、白色の羊毛状の厚いコロニーを作った。辺縁部は寒天面上にそって無色の菌糸がうすく延びている。

中央部の直径 25 mm では孢子の着生が見られ、その色は周辺部では無色、中心部分でうすい黄土色 (Colonial Buff) であった。裏面にはわずかにひだができるが、色素の生成は見られなかった。

7 日目で直径 67 mm、辺縁部 3 mm は寒天面にそったうすい菌糸が占めていた。その内側 5 mm の幅で白色の羊毛状菌糸があり、それから内側は密に孢子が着生していた。その色は辺縁部ではうす黄色 (Primrose Yellow) であるが、更に内側は黄土色 (Olive Ocher) であり、中心部は濃い褐色 (Brownish Olive) であった。コロニー表面の色、形状による紋様は観察されなかった。裏面は中心部直径 11 mm に灰褐色 (Olive Brown) の着色が見られるが、ひだはほとんど生じていなかった。

菌糸はほふく性で、かつ、無色で隔壁を有し、幅は 2.7 ~ 9.5  $\mu$ m で分枝性である。分生子形成細胞は菌糸の細胞膜が肥厚した細胞 (Foot cell) を有し、隔壁を持たない。孢子柄は表面平滑で幅 10 ~ 12  $\mu$ m、長さ 1.5 ~ 2.4 mm である。頂

孢子の着生は極めて密であるが、表面の紋様は見られない。裏面は放射状の大きなひだが目立つが、色素は全く生産されていない。

#### c) 麦芽エキス寒天培地

4 日目で直径 50 mm のコロニーを作るが、他の培地に比較して気中菌糸の伸長が少なく全体に平らである。中央部 38 mm で孢子の形成が見られ、その色は濃い黄土色 (Buffy Olive) であるが、中心部の古い部分は濃いオリーブ色 (Dark Olive) である。他の培地に比較して孢子柄が短く厚みが乏しい。また孢子着生の密度が他の培地に比べると劣る。裏面にはひだは見られず、色素の生成も認められない。

7 日目では直径 75 mm に広がり、ほぼ全面に孢子の着生が見られる。孢子の色は全体に黒褐色 (Olivaceous Black) であり、中心部から同心円状に孢子の着生状況が異なり、全体として同心円状の紋様が認められる。この紋様は裏面からも認められるが、寒天への色素の放出は認められない。またひだも観察されない。

端に直径 31 ~ 37  $\mu$ m の球状の分生孢子のうを形成し、その表面に放射状の梗子を 2 段に形成し、その先端に芽胞子を着生する。孢子は数珠状に連なって生じ、孢子頭は放射状であり、直径 0.2 ~ 0.35 mm のほぼ球状である。芽胞子は直径 3 ~ 4  $\mu$ m でほぼ球状であり、表面はほぼ平滑で、1 細胞で構成されている。

#### b) CYA 培地 (ツァベック-イーストエキス-アガー培地 25 °C 生育)

生育は普通で 4 日目で直径 52 mm のコロニーを形成し、中央部の直径 34 mm の中では黒褐色 (Olivaceous Black) の孢子を密に着生する。しかし、その外周部には羊毛状の密な白色の菌糸が見られ色素の生成は見られない。頂のうは気中菌糸よりも上部に伸長する。裏面にははっきりした放射状のひだができるが、色素の生成は見られない。

6 日目で直径 86 mm のシャーレ全面に広がり、7 日目では周辺の 2 mm がわずかに白い菌糸が見られる位で、全面に黒褐色孢子がおおっている。

#### d) 生育条件

pH 2.0 ~ 9.0 (至適 pH 4.5 付近)

温度 20 °C ~ 45 °C (至適温度 37 °C)

#### (2) 本菌株の分類学上の位置について

下記の本菌株の菌学的性質と前述の「ザ・ジーナス・アスペルギルス (The Genus *Aspergillus*)」に記述されたアスペルギルス属の菌学的性質を比較することによって、本菌は、アスペルギルス属に属する糸状菌であると判定された。

① 孢子は 1 細胞からなり、直線状に連鎖するが分枝はしない。

② 分生子柄は球状の頭部を持ち、2 段の梗子を生じ、孢子はびん形の梗子に生成される。

③ 分生子柄は Foot cell から生じ、隔壁を持たない。

④ 菌糸は、隔壁を有し無色である。

さらにツァベック-寒天培地に生育したコロニーの生育状態からアスペルギルス属の分類記述に基づいて分類を行なうと、下記の特徴からアスペルギルス・ニガーグループに分類された。

① 2 段の梗子を生じる。

② 胞子の着生は放射状であり、胞子頭は全体としてほぼ球状に形成されるが、古くなった胞子頭はゆるく分裂することがある。

③ 頂のうは球状 (31 ~ 37  $\mu\text{m}$ ) であり、胞子柄は充分長い。

④ 分生胞子は黒っぽい色をしている。

さらにアスペルギルス・ニガーグループの細かい記述に従って分類すると、下記の点からアスペルギルス・ツリングェンシス (*Aspergillus tulingensis*) に近縁な菌であると思われる。

① 2 段の梗子を生じる。

② 分生胞子の色は若い状態の時一時的に灰褐色 (Olive Brown) を示す時期がある

③ 分生胞子は、最初は無色透明であるが急速に着色して黒色に近くなる。

④ 分生胞子は直径 3 ~ 4  $\mu\text{m}$  で 5  $\mu\text{m}$  以下である。

⑤ コロニーの裏側に着色は見られない。

⑥ 分生胞子柄は、多くは 2 ~ 3  $\mu\text{m}$  であり 5

マグネシウム 0.05 %、塩化カルシウム 0.01 %、(pH 6.5) の培地が挙げられる。培養は通常 25 ~ 37  $^{\circ}\text{C}$  の範囲で、好適には 30  $^{\circ}\text{C}$  付近で行なわれる。培養開始の pH は 6 ~ 8 の範囲であるが、好適には 6.5 付近である。このような条件下で、30 ~ 72 時間振盪又は深部攪拌培養すれば、培養物中にフルクトシルアミン・オキシダーゼが効率良く生産され、蓄積する。

本酵素は通常は菌体中に存在するので、培養物を濾過して菌体を集め、適量の緩衝液に懸濁して菌体を破壊することによって酵素を可溶化することが必要である。こうして得られた酵素含有液から、核酸、細胞壁断片等を取り除くことによってフルクトシルアミン・オキシダーゼを得ることができる。更に本酵素は必要により酵素の単離精製の常法に従って、例えば (1) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、(2) 硫酸分画、(3) フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー、(4) セファデックス G-200 カラムクロマトグラフィー等の方法、又はその他の方法を必要に応じ

を越えない。

本菌株は通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研条寄第 2651 号 (FERM BP-2651) として寄託されている。

次に本発明で使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適宜含有していれば合成培地、天然培地のいずれでも使用可能である。炭素源としては例えばグルコース、フラクトース、キシロース、グリセリン等を用いることができる。窒素源としてはペプトン、カゼイン消化物、あるいは酵母エキス等の窒素性有機物が好適に使用できる。無機物としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、鉄、コバルト等の塩類が使用できる。

本発明においては、フルクトシルアミノ酸を含有する培地で培養したときに、フルクトシルアミン・オキシダーゼが最も収量よく得られる。該培養培地の好適な例としては、例えばフルクトシルグリシン 1.0 %、酵母エキス 0.5 %、ポリペプトン 0.5 %、磷酸水素 1 カリウム 0.2 %、硫酸

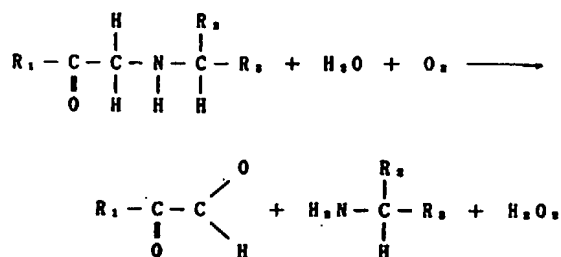
を組み合わせて用いることにより、精製製品を得ることができる。本酵素の精製の具体例を示すと下記の通りである。

培養物中から菌体を集めたのち、0.02 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、1 % 量のトリトン X-100 を加え溶解する。ミキサーを用いて軽く菌砕した後、ダイノミル (シンマルエンタープライズ社 (スウェーデン) 製) を使用して菌体を破碎する。遠心分離して上清を集め、DEAE-セルロースカラム (0.02 M トリシュー塩酸緩衝液、pH 8.5 に平衡化してある) にかけて酵素を吸着させる。0.02 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.5) で洗浄したのち、0.5 M 食塩濃度にして酵素を溶出させる。活性画分を集め、これに硫酸粉末を 6 % 濃度になるように加える。これを硫酸を 6 % 含有した 0.02 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.5) に平衡化したフェニルセファロースカラムに通過させて酵素を吸着させる。このカラムを 2 % 硫酸の入った同じ緩衝液で洗った後に、2 % 硫酸を含んだ 0.02 M トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.5)

と 10 % エタノールを含んだ 0.02 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) をつなぐことによって形成した濃度勾配を持った緩衝液で溶出する。活性部分を濃縮した後、0.02 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に平衡化した DEAE-セファデックス A-50 カラムにかける。これを同じ緩衝液中の 0 から 0.5 M 食塩濃度勾配によって溶出する。その活性部について、0.1 M 食塩を含有したリン酸緩衝液、pH 7.5 で平衡化したセファデックス G-200 のカラムクロマトグラフィーを行ない精製酵素を得ることができる。

次に本発明によるアマドリ化合物の定量法について説明する。

本発明の定量法は下記の反応を基礎としている。



この式中、 $\text{R}_1$  は  $-(\text{CH}(\text{OH}))_n-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $n$  は 0 ~ 4 の整数、 $\text{R}_2$  は  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖残基を示す。また  $\text{R}_2$  は  $-(\text{CH}_2)_n\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  又は  $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  である。

本発明の定量法における被検液としては、上記反応式に示されたアマドリ化合物を含有する液であればいかなるものでもよく、例えば醤油や蜂蜜のような高濃度のアミノ酸又は糖を含有するものが好適に用いられる。また生体試料などに由来する蛋白やポリペプチド鎖に存在するものについ

ては、温和な条件で遊離させる手段に解決すべき問題はあるが、定量の果たす効果が更に大きい。

上記のフルクトシルアミン・オキシダーゼをアマドリ化合物の含有液に作用させる場合には、pH 6.5 ~ 10 及び温度 50 °C 以下、好ましくは pH 7.5 ~ 8.5 及び温度 30 ~ 40 °C の条件で、通常は 10 ~ 20 分間程度反応させる。pH の調整には、前記反応の pH 範囲を維持することができ、かつ酵素反応を阻害しない任意の緩衝液が用いられ、例えばリン酸カリウム緩衝液、リン酸カリウム-炭酸ソーダ緩衝液、クエン酸-リン酸ソーダ緩衝液等が好ましい。フルクトシルアミン・オキシダーゼの使用量は、終点分析法においては通常は 0.5 単位/mL 以上である。

本発明においては、下記の何れかの測定法によりアマドリ化合物を定量する。

(1) 酵素反応により生成する過酸化水素の測定法：

反応により生成する過酸化水素を、過酸化水素定量の常法、例えば発色方法、過酸化水素電極を

用いる方法等により定量し、あらかじめ別に用意した過酸化水素量とアマドリ化合物量との標準曲線よりアマドリ化合物を定量する。なお発色法により過酸化水素を測定する場合には、例えば前記の「力価の測定法」に記載した測定法と同様に操作する。

(2) 酸素消費に基づく定量法：

この定量法は、反応開始時の酸素量より反応終了時の酸素量を差引いた値（酸素消費量）を測定し、あらかじめ別に用意した酸素消費量とアマドリ化合物量との標準曲線よりアマドリ化合物を定量するもので、酸素量の測定は常法、例えばワールブルグ検圧法、酸素電極法等により行なわれる。なお酸素電極法により酸素消費量を測定する場合には、例えば前記の「力価の測定法」に記載した測定法と同様に操作する。

本発明のアマドリ化合物定量用試薬は、フルクトシルアミン・オキシダーゼ及び酵素作用を行なわしめるに好適な pH 範囲、一般に pH 6.5 ~ 10、好ましくは pH 7.5 ~ 8.5 を与える緩衝液、



更に反応生成物を測定する場合には、必要により発色剤等を適宜組合せて成る。

フルクトシルアミン・オキシダーゼとしては、液状、粉末状の何れでもよく、終点分析を行なうには1検体当りの酵素量は通常は0.5単位/ml以上である。緩衝剤としては、例えばリン酸カリウム緩衝液、リン酸カリウム-炭酸ソーダ緩衝液、クエン酸-リン酸ソーダ緩衝液等が好ましい。

反応生成物を測定する際の発色剤としては、該生成物と反応して発色する物質が用いられ、過酸化水素の発色剤としては、パーオキシダーゼと例えば4-アミノアンチピリン / N,N-ジメチルアニリン、4-アミノアンチピリン / フェノール、4-アミノアンチピリン / N,N-ジエチルアニリン、ABTS、MBTH / N,N-ジエチルアニリン、4-アミノアンチピリン / 2,4-ジクロロフェノールサルホネート等の組合せが挙げられる。

本発明のアマドリ化合物定量用試薬は冷暗所、特に5℃以下に保存することが好ましい。

#### <発明の効果>

本発明によれば、従来困難であったアマドリ化合物の測定が容易になり醤油等の食品や輸液等の製造時及び保存中の状態を反映するアマドリ化合物を効率良く測定することができる。また、尿や血液及び生体に由来する蛋白質やポリペプチド鎖に結合したものの、適当なペプチダーゼを作用させ、遊離状態にしたのちには同様に測定することができ、特に糖尿病の病態測定に利用できる。

次に本発明を実施例により説明する。

#### <実施例>

##### 実施例1

アスベルギルス・エスピー 1005 (FERM BP-2651) をフルクトシルグリシン 1.0 %、イーストエキス 0.5 %、ポリペプトン 0.5 %、リン酸2カリウム 0.2 %、硫酸マグネシウム 0.05 %、塩化カルシウム 0.01 % を含有した培地 (pH 6.5) 100 ml を入れた坂口フラスコ (500 ml 容量) に植菌し、30℃、24時間、振盪培養した。この種培養物を3Lのミニジャーファーマンター

中の同一培地 2 L に植え、通気量 2 L / 分、攪拌速度 400 r.p.m. の条件で 30℃、48時間深部攪拌培養した。培養物を濾過して菌体を集めた。その培養菌体の一部 (100 g) に 0.02 M トリスメタン硫酸緩衝液 (1 % トリトン X-100 を含有する) pH 8.0、250 ml を加え菌を良く分散させ、氷で 4℃まで冷却した。これをミキサーで軽く磨砕した後、ダイノミルによる菌体の破砕処理 (3000 r.p.m.、7分) を行なった。破砕容器は氷冷水によって充分冷却した。破砕液を 12000 r.p.m. で 15分遠心分離して上清部分を集め、275 ml の液を得た。この液を 0.02 M トリスメタン硫酸緩衝液 pH 8.5 で平衡化した DEAE-セルロースを充填したカラム (直径 9 cm × 長さ 35 cm) にかけて酵素を吸着させた。0 → 0.5 M 食塩濃度勾配による溶出を行なって活性部位を集めた。次いでこの酵素液に 6 g / 100 ml の割合に硫酸を溶解させたのち、あらかじめ 6 % 硫酸含有 0.02 M トリスメタン硫酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化したフェニルセファロースを充填したカラム (直径 2.

5 cm × 長さ 23 cm) を通過させて酵素を吸着させた。これを硫酸 2 % を含んだ同じ緩衝液で洗浄して不要な蛋白を除いた後、2 % 硫酸を含んだ 0.02 M トリスメタン硫酸緩衝液 (pH 8.5) と 10 % エタノールを含んだ 0.02 M トリスメタン硫酸緩衝液 (pH 9.0) をつなぐことによって作った濃度勾配を持った緩衝液で溶出した。活性部分を濃縮した後、0.02 M トリスメタン硫酸緩衝液 (pH 8.5) に平衡化した DEAE-セファデックスを詰めたカラム (直径 2.5 cm × 長さ 35 cm) にかけて酵素を吸着させた。これを同じ緩衝液中の食塩濃度勾配 (0 から 0.5 M) によって溶出した。活性部をアミコン社製限外濾過膜装置 (分画膜 10000) にて濃縮したのち、(あらかじめ 0.1 M 食塩含有の 0.05 M トリスメタン硫酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した) セファデックス G-200 を充填したカラム (直径 1.2 cm × 長さ 100 cm) にかけてゲル濾過した。活性部を集めた結果、4.2 単位 / 蛋白 mg の酵素が得られた。収率は 27 % であった。

## 実施例 2

4-アミノアンチピリン 0.05 % 0.3 ml  
 2,4-ジクロロフェノールサルホ  
 ネート 0.15 % 0.3 ml  
 リン酸緩衝液 0.2 M、pH 7.5 1.5 ml  
 パーオキシダーゼ 400 単位/ml 10  $\mu$  l  
 フルクトシルバリン 1.5 mM 0~100  $\mu$  l  
 蒸留水を加えて全量を 2.80 ml に調整した。

上記反応液の入った試験管にフルクトシルアミン・オキシダーゼ (165 単位/ml 含有) 200  $\mu$  l づつを加えて、37  $^{\circ}$ C にて 10 分間反応させたのち、発色した色素を 510 nm で比色定量した。その結果、加えたフルクトシルバリンと吸光度の間に比例関係が認められた。

## 実施例 3

オキシゲンモニター (米国 YSI 社製) の酸素測定容器に 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を 1.5 ml とり、カタラーゼ (50000 単位/ml) 20  $\mu$  l、フルクトシルアミン・オキシダーゼ (165 単位/ml 含有) 200  $\mu$  l 及び蒸留

ぜ + 660 単位パーオキシダーゼ/10 ml

使用に際しては 3 種を混合し、試料溶液 0.5 ml に対し試薬溶液 2.5 ml を使用する。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は本酵素の至適 pH を示すグラフであり、第2図は本酵素の安定 pH を示すグラフであり、第3図は本酵素の作用適温の範囲を示すグラフである。第4図は熱安定性を示すグラフである。

なお、第1図及び第2図における使用緩衝液は下記のとおりである。

○-○: 0.1 M リン酸カリウム緩衝液

△-△: 0.1 M トリス-塩酸緩衝液

×-×: 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液

特許出願人 財団法人 野田産業科学研究所

水 1.2 ml を加えて、37  $^{\circ}$ C で 3 分間攪拌を続けて平衡に達せしめた。酸素電極をさしこんで密閉したのち、醤油溶液 (pH 7.0 に調整後、水で 2 倍に希釈したもの) 10  $\mu$  l を加えて反応させた。反応経過はモニターに接続した記録計ですべて記録し、10 分後に反応結果を測定したところ、反応前から 74 目盛の酸素濃度の変化が読みとれた。同様にしてフルクトシルアミン・オキシダーゼの代りに水を用いて操作した場合には、14 目盛の変化が読みとれた。その差は 60 目盛であった。醤油溶液の代りにフルクトシルグリシンの標準液を用いて同様に操作して得た検量線から、この値は 0.25  $\mu$  mol と算出された。

## 実施例 4

## 測定用試薬

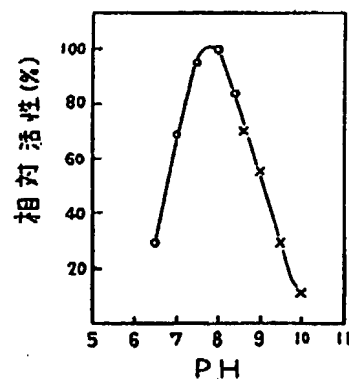
## 試薬の調製

A: 5 mg/75 ml 4-アミノアンチピリン (0.15 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) )

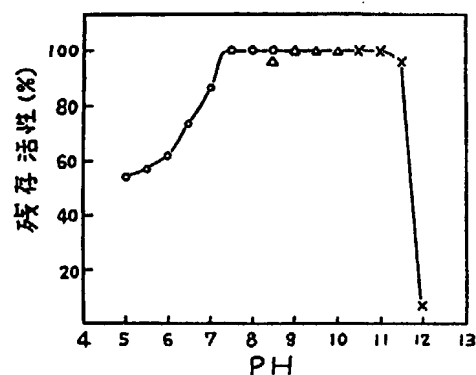
B: 15 mg/15 ml N,N-ジメチルアニリン、

C: 132 単位フルクトシルアミン・オキシダー

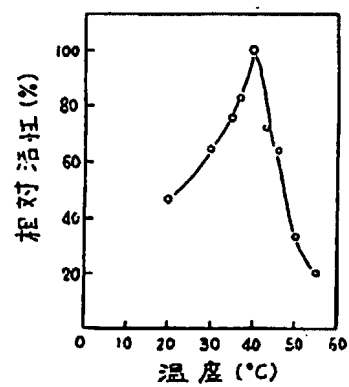
第1図



第2図



第3図



第4図

